



Lublin, 1.08.2022

### Recenzja

rozprawy doktorskiej na stopień doktora nauk chemicznych **mgr inż. Julii Krzywik**  
pt. „**Synteza, analiza spektroskopowa oraz ocena właściwości przeciwnowotworowych pochodnych kolchicyny**”.

(Rozprawa została zrealizowana w ramach programu MNiSW „Doktorat wdrożeniowy”, UMO-0017/DW/2018/02)

Promotor: **Prof. dr hab. Adam Huczyński**

Opiekun pomocniczy: **mgr inż. Witold Mozga**

Badania naukowe skierowane na poszukujące nowych substancji aktywnych biologicznie stanowią bardzo istotny fragment współczesnej syntezy organicznej, medycznej i farmaceutycznej, są one przedmiotem nieustannego zainteresowania nie tylko nauki akademickiej, ale również przemysłu. Szczególną uwagę, w tym kontekście, cieszą się badania nad modyfikacją związków aktywnych farmaceutycznie o pochodzeniu naturalnym, gdyż mają one dobrze rozpoznane właściwości lecznicze. Ponadto ich modyfikacja chemiczna powinna, z wysokim stopniem prawdopodobieństwa, doprowadzić do nowych substancji o zadanych właściwościach farmaceutycznych, a więc jest to podejście mniej kosztowne, w porównaniu do empirycznego przeszukiwania dużych bibliotek substancji chemicznych. Taką też strategię podjęła Autorka przedstawionej Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Julii Krzywik, przedstawiając wyniki badań nad syntezą i właściwościami oraz aktywnością biologiczną pochodnych kolchicyny, które zdaniem Autorki, mają niewykorzystany dotąd wysoki potencjał farmaceutyczny.

Mimo zwyczajowego oczekiwania, że wynikiem doktoratu wdrożeniowego będzie wdrożenie nowego produktu, lub istotne ulepszenia istniejącego procesu jego wytworzenia, spora część takich doktoratów w dyscyplinach farmaceutycznych, medycznych lub chemicznych kończy się na wcześniejszym etapie badań – gdy nowy lek jeszcze nie został opracowany, ale otrzymane wyniki istotnie poszerzyły wiedzę prowadzącą do jego wytworzenia. Podobnie w przypadku rozprawy doktorskiej mgr inż. Julii Krzywik: wyniki przeprowadzonych badań nie doprowadziły jeszcze do powstania nowego leku, ale posłużyły one podstawą do rozpoznania, przez Pracodawcę, kierunków dalszych badań nad nowymi produktami oraz do zabezpieczenia własności intelektualnej na potencjalne przyszłe wynalazki - struktury nowych cząsteczek chemicznych uznanych za kandydatów na nowe leki przeciwnowotworowe. Stwierdzić również należy, że założenia doktoratu zostały z nadmiarem osiągnięte, gdyż jako wdrożenie zostało uznane wytworzenie nowych technologii syntezy wolnych patentowo pochodnych kolchicyny, które uzyskały ochronę patentową. Ponadto część z syntetyzowanych związków już poszerzyli portfolio

oferty handlowej Pracodawcy - z łatwością można ich rozpoznać w katalogu substancji sprzedawanych firmą TriMen Chemicals:

[http://www.advamacs.com/search.html?search\\_for=MethylaminoColchicine](http://www.advamacs.com/search.html?search_for=MethylaminoColchicine) ;

[http://www.advamacs.com/search.html?search\\_for=Colchicine](http://www.advamacs.com/search.html?search_for=Colchicine) ;

<http://www.advamacs.com/index.html>.

A więc, w przypadku rozprawy doktorskiej mgr inż. Julii Krzywik z całym przekonaniem można stwierdzić, że praca spełnia kryteria doktoratu wdrożeniowego, gdyż *przedmiotem programu jest tworzenie warunków do rozwoju współpracy podmiotów systemu szkolnictwa wyższego i nauki z otoczeniem społeczno-gospodarczym, prowadzonej w ramach szkół doktorskich i polegającej na kształceniu doktorantów we współpracy z zatrudniającymi ich przedsiębiorcami albo innymi podmiotami, której efektem będzie wdrażanie w tych podmiotach wyników prowadzonej przez doktorantów działalności naukowej.*

Przedstawione w rozprawie badania bazowały się na syntezie nowych (oraz wcześniej opisanych) pochodnych kolchicyny z następującą ich analizą z wykorzystaniem wielorakich metod analitycznych, fizykochemicznych tudzież spektralnych. Również, w ramach współpracy z naukowcami z polskich i zagranicznych ośrodków naukowych, cytotoksyczność nowych substancji względem linii komórkowych nowotworów ludzkich, ich selektywność względem wybranych linii komórkowych i zdolność do zwalczania lekoopornych komórek nowotworowych zostały zbadane. Wybrane metody dokowania molekularnego oraz próby wyjaśnienia zależności struktura a aktywność biologiczna związków zostały podjęte także we współpracy.

Przedłożona do recenzji Rozprawa doktorska to liczący 65 stron wydruk komputerowy do którego zostały załączone wydruki oryginalnych publikacji i przyznaných patentów.

Na uwagę zasługuje układ przedstawionej rozprawy. Autorka kurtuazyjnie przedstawiła obszerne, lecz uzasadnione **PODZIĘKOWANIA** wszystkim osobom, które okazali jej wsparcie, następnie umieściła zwięzłe **STRESZCZENIE** (w języku polskim oraz angielskim) w którym jednoznacznie zdefiniowała przedmiot badań.

Prosty **SPIS TREŚCI**, podany na 11 stronie, istotnie ułatwia nawigację po rozprawie, a spis publikacji i patentów, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, jednoznacznie podkreśla wartość przedmiotu badań.

Następnie jako pierwszy rozdział rozprawy, Autorka przedstawił **CEL PRACY**, w którym podzieliła ona przedmiot badań na poszczególne zadania i jednoznacznie wskazała swój udział osobisty w uzyskanych wynikach. Podzielony na kilka zadań cel pracy można zreasumować następująco: opracowanie struktury oraz procedury syntetycznej nowych wolnych patentowo analogów kolchicyny o co najmniej nie pogorszonym potencjale wykorzystania (w porównaniu do kolchicyny naturalnej) w walce z nowotworami.

W drugim rozdziale rozprawy został przedstawiony **DORÓBEK NAUKOWY** i przebieg kariery zawodowej Autorki. Następnie został ponownie przedstawiony wykaz publikacji i patentów stanowiący podstawę przedłożonej rozprawy, ale tym razem zawierał on również informacje o wkładzie Autorki i jej udziale (merytorycznym oraz procentowym) w każdym z powstałych dzieł. Umieszczona tabela jeszcze raz podsumowuje te 5 publikacji oraz 2 polskie patenty. Później przedstawiono wykaz prezentacji, głównie na konferencjach krajowych oraz wykaz 3 projektów badawczych, w których Autorka była wykonawcą, tudzież wykaz nagród, w większości za osiągnięci akademickie.

*! Istotnym jest fakt, że mgr inż. Julii Krzywik jest współautorem większej ilości publikacji i prezentacji konferencyjnych, aniżeli te stanowiące podstawę Rozprawy. Jednakże wątek ten nie podlega ocenie w ramach recenzowania przedłożonej Rozprawy.*

Interesującym jest kolejny rozdział 3: **WPROWADZENIE**. W tym rozdziale Autorka w formie przystępnej przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący dynamiki zwiększenia ilości przypadków nowotworowych u ludzi, właściwości biologicznych kolchicyny oraz jej potencjale być wykorzystanym w terapii chorób onkologicznych, tudzież wybrane zagadnienia z zakresu zależności struktura - aktywność przeciwproliferacyjna pochodnych kolchicyny. Podana w tym rozdziale informacje służy dobrym wprowadzeniem do treści merytorycznej rozprawy.

Podstawowym jednak rodzilem uznać należy kolejny rozdział: **OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ**. Rozdział ten liczy 24 stron maszynopisu i posiada własną złożoną strukturę podrozdziałów. Rozdział zawiera logiczne wprowadzenie i za razem streszczenie prac oryginalnych, będących podstawą rozprawy. Jak wynika z jego treści, Autorka postanowiła wprowadzić w strukturę kolchicyny dwie podstawowe modyfikacji: podstawić grupę C10 metoksyłową na grupę aminometyłową oraz podstawić grupę C7 amidowa na jeden z wielu wybranych bioizosterów. Po otrzymaniu kilka serii pochodnych, różniących się podstawnikami przy C7, Autorka przekazała próbki do przeprowadzenia badań biologicznych. Określono wartości IC<sub>50</sub>, indeks oporności (RI) wskazujący na skuteczność substancji względem lekoopornej linii LoVo/DX, oraz indeks selektywności (SI) względem komórek normalnych BALB/3T3.

Podsumowując badania biologiczne stwierdzić można, że w śród przedstawionych w rozdziale 29 (całkowita zadeklarowana ilość nowych substancji otrzymanych w ramach realizacji doktoratu to 110) nowych pochodnych większość cechuje się znacząco przewyższającą cytotoksycznością w porównaniu

zarówno do macierzystej kolchicyny jak i do kontrolnych związków referencyjnych doksorubicyny i cisplatyny, oraz niskim indeksem (leko)odporności. Ciekawe wyniki zostały również otrzymane podczas sprawdzenia indeksu selektywności: okazało się, że 3 substancji były istotnie selektywne wobec LoVo (nowotwór jelita grubego), 3 wobec MCF-7 (nowotwór piersi), oraz jedna wobec A549 (nowotwór płuc).

*! Niestety umieszczona w rozdziale tabela 2: IC<sub>50</sub>, zawiera jedynie dane dotyczące wybranych 18 związków, do tego częściowo innych, aniżeli rysunek 6: RI i rysunek 7: SI. Nie pozwala to na samodzielną interpretację wyników i weryfikację niektórych wniosków Autorki, np. że związki IV-20 oraz IV-21 są zdolne do przełamania lekooporności komórek LoVo/DX. A więc dla pełnego zrozumienia treści rozprawy niezbędna jest szczegółowa analiza porównawcza wszystkich załączonych publikacji.*

**? Na tym etapie wynika pytanie odnośnie do niektórej pozornej sprzeczności metodologicznej, gdyż selektywność była wyznaczana względem komórek normalnych fibroblastów mysich a nie komórek normalnych ludzkich jelita grubego, piersi oraz płuc?**

Struktury wybranych związków zostały przekazane do modelowania komputerowego i badań dokujących, które wykazały na możliwość skutecznego koordynowania związków przez tubulinę oraz na dodatkowe oddziaływania w utworzonych kompleksach spowodowane obecnością wprowadzonych podstawników.

Wśród wszystkich przetestowanych związków, uwzględniając ich cytotoksyczność, selektywność i indeks lekooporności, do badań przedklinicznych zostało wytypowano: po jednej pochodnej aminowej, karbaminianowej, tiomocznikowej, triazolowej wykazujących aktywność względem wszystkich testowanych linii nowotworowych, jak również 6 bardziej selektywnych względem poszczególnych linii komórkowych związków przedstawionych w Tabeli 4.

W kolejnym podrozdziale Autorka usystematyzowała wykonaną pracę za pomocą 21 cząstkowej konkluzji, dotyczącej jak to technicznych aspektów syntezy wybranych pochodnych (np. „wykazałam ze z dobrym rezultatem, z użyciem chloromrówczanu pirydyny, można otrzymać aldehydy z odpowiednich alkoholi i użyć je następnie do reakcji reduktywnego aminowania”...), jak i te dotyczące wstępnych prób uogólnienia zależności struktura a właściwości.

W rozdziale **PODSUMOWANIE**, Autorka jeszcze raz podsumowała otrzymane wyniki.

*! Struktura rozprawy doktorskiej uwzględnia kilkokrotne powożenia tych samych konkluzji przedstawionych w nieco inny sposób w różnych rozdziałach i podrodzinach. Wydaje się to być jedynie nieistotną osobliwością stylistyczną wynikającą z chęci Autorki donieść treść rozprawy w jak najbardziej zrozumiały sposób.*

Rozdziale **SPIS CYTOWANEJ LITERATURY** zawiera 110, starannie sformatowanych, pozycji, co jest wartością zrównoważoną dla tego typu badań.

Jako **ZALĄCZNIK DO ROZPRAWY**, na stronach nieposiadających jednolitej numeracji, przedstawiono wydruki pełnych tekstów wszystkich 7 prac: 5 publikacji w wysokiej randze recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i 2 patenty Polskie. Właśnie te publikacji liczące łącznie 21 IF (Średni zadeklarowany udział procentowy Autorka wynosi ok. 50%) oraz dwa patenty stanowią treść merytoryczną recenzowanej rozprawy.

**Publikacja #1: *Molecules* 2020, 25, 1789.** Synthesis, Antiproliferative Activity and Molecular Docking Studies of Novel Doubly Modified Colchicine Amides and Sulfonamides as Anticancer Agents.

Udział mgr inż. Julii Krzywik w tej publikacji, który sprowadzał się głównie do zaplanowania struktur cząsteczek, ich syntezy i identyfikacji, jak również do przygotowania manuskryptu i odpowiedzi recenzentom, został oszacowany na 45%.

Opublikowane badania objęły syntezę nowych amidów oraz sulfanilamidów metylaminowej pochodnej kolchicyny. Otrzymane pochodne zostały scharakteryzowane prawidłowo za pomocą metod spektroskopowych, a struktury 8 wybranych potwierdzone metodami dyfrakcji promieni rentgenowskich.

*Dalsze badania zostały przeprowadzone we współpracy. Zostały obliczone geometrii oraz właściwości elektronowe otrzymanych cząsteczek, a następnie przeprowadzone badania dokowania cząsteczek do tubuliny. Podstawowe właściwości biologiczne syntetyzowanych związków IC<sub>50</sub> oraz SI zostały wyznaczone eksperymentalnie. Mimo tego, że część związków wykazała się wysoką aktywnością biologiczną i selektywnością względem linii nowotworowych, zależności pomiędzy siłą oddziaływania cząsteczka – białko a aktywnością tej cząsteczki wykryć się nie udało. Najbardziej rokującym okazała się pochodna kwasu 4,4,4-trifluorobutanowego, która była zarówno wysoce aktywna, względem wszystkich testowanych linii nowotworowych, i selektywna. Udało się również rozpoznać bardziej selektywne względem linii MCF-7 pochodną cechująca się SI=10.*

*! Jeżeli interpretacja części biologicznej i obliczeniowej może być podstawą do dyskusji, to część chemiczna publikacji została wykonana wzorcowo nie pozostawiać miejsca dla dalszych komentarze. Wszystkie syntezy zostały starannie zaplanowane, przeprowadzone i opisane, a otrzymane produkty odpowiednio scharakteryzowano.*

**Publikacja #2: *Molecules* 2020, 25, 3540.** New Series of Double-Modified Colchicine Derivatives: Synthesis, Cytotoxic Effect and Molecular Docking.

Udział mgr inż. Julii Krzywik w tej publikacji, który się sprowadzał się głównie do zaplanowania struktury cząsteczek, ich syntezy i identyfikacji, jak również do przygotowania manuskryptu i odpowiedzi recenzentom, został oszacowany na 55%.

Opublikowane badania objęły syntezę nowych pochodnych kolchicyny zawierających drugorzędowe grupy aminowe w pozycjach C10, i C7. Seria 14 związków różniła się jedynie podstawnikiem przy C7 atomie azotu i została otrzymana według jednej klasycznej procedury redukcyjnego aminowania znanej diaminopochodnej kolchicyny. Wszystkie substancje zostały utworzone z umiarkowanymi wydajnościami oscylującymi ok 45% i opisane zgodnie z ich widmami  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR i MS.

Podobnie do publikacji #1, IC<sub>50</sub> zostały zmierzone dla wszystkich związków, a SI oraz RI obliczone jako odpowiednie pochodne IC<sub>50</sub>. Badania teoretyczne zostały przeprowadzone i oszacowano energię wiązania testowanych związków do tubuliny. Wyniki wykonanego dokowania molekularnego wskazują na możliwość mocnego oddziaływania miedzycząsteczkowego w kompleksach gość-gospodarz.

Jako ogólny wniosek tej publikacji uznać można stwierdzoną wysoką aktywność biologiczną niektórych nowych pochodnych kolchicyny, a w szczególności tej zawierającej w pozycji C7 grupę 2-chlorobenzylaminową. Niestety nie udało się ustalić wyraźnej korelacji SAR.

**? Ponieważ, z syntetycznego punktu widzenia, otrzymywanie pochodnych przedstawionych w publikacji #2 jest znacznie łatwiejsze aniżeli pochodnych przedstawionych w publikacji #1, i w ten sam czas, wkład Autorki jest oszacowany jako o 22,(2)%  $\{(55-45)*100\%/44\}$  większy, nie jest jasne jaki algorytm został przyjęty do wyliczenia udziału poszczególnych współautorów tej publikacji.**

**Publikacja #3: European Journal of Medicinal Chemistry, 215, 2021, 113282.** An insight into the anticancer potential of carbamates and thiocarbamates of 10-demethoxy-10-methylaminocolchicine

Udział mgr inż. Julii Krzywik w tej publikacji, który się sprowadzał się głównie do zaplanowania struktury cząsteczek, ich syntezy i identyfikacji, jak również do przygotowania manuskryptu i odpowiedzi recenzentom, został oszacowany na 40%.

Opublikowane badania objęły syntezę nowych pochodnych kolchicyny zawierających grupę metyloaminową w pozycjach C10, oraz grupy karbaminianowe lub tiokarbaminianowe w pozycji C7. Seria 17 związków różniła się jedynie podstawnikiem przy C7 atomie azotu i została otrzymana według jednej klasycznej procedury polegającej na reaktywności fosgenu (lub tiofosgenu) w reakcjach z aminami i alkoholami. Substancje zostały utworzone z umiarkowanymi lub dobrymi wydajnościami (18% - 95%) i scharakteryzowane zasobami spektroskopii  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR i MS. Strukturę części otrzymanych związków udało się potwierdzić wykonując pomiary rentgenostrukturalne, które również wykazały zbieżność geometrii w części kolchicyny. Obliczone geometrii nowych cząsteczek oraz ich

właściwości elektronowe, tudzież zdolność do tworzenia wiązań wodorowych zostały wykorzystane do budowy modelu oddziaływania cząsteczek z tubuliną.

Właściwości biologiczne serii związków zostały oznaczone eksperymentalnie. Nowe pochodny wykazały się znacznie większą aktywnością antyproliferacyjną, a część z nich była również wysoce selektywna względem komórek nowotworowych (z wyjątkiem linii lekoopornej). Niestety w większości nowe modyfikacje nie pozwoliły istotnie przełamać lekooporność nowotworów, wykazując wysokie wskaźniki RI. Obliczenia komputerowe wykazały, że nowe związki mają spore powinowactwo do tubuliny, jednak nie jest ono znacząco większe aniżeli w przypadku wyjściowej kolchicyny. Podjęte obliczeniowe próby odnalezienia ilościowej zależności struktura – aktywność zostały optymistycznie podsumowane jakkolwiek doprowadziły one do akceptowalnej zbieżności pomiędzy teoretycznym i eksperymentalnym znaczeniem IC<sub>50</sub> jedynie w ograniczonej ilości przypadków. Otrzymane wyniki pozwoliły współautorom wytypować 6 najlepiej rokujących substancji – kandydatów na badania przedkliniczne.

Od strony chemicznej przedstawione wyniki nie budzą zastrzeżeń.

***? Dodatkowego wyjaśnienia wymaga jedynie fakt rozbieżności obliczonej energii oddziaływania tubuliny oraz kolchicyny (i jej C10 metylamino pochodnej), którą można zaobserwować porównując Artykuły II i III.***

**Publikacja #4: Bioorg Med Chem Lett. 2021, 47:128197.** Synthesis and antiproliferative screening of novel doubly modified colchicines containing urea, thiourea and guanidine moieties

Udział mgr inż. Julii Krzywik w tej publikacji, który się sprowadzał się głównie do zaplanowaniu struktury cząsteczek, ich syntezy i identyfikacji, jak również do przygotowania manuskryptu i odpowiedzi recenzentom, został oszacowany na 60%.

Opublikowane badania objęły syntezę i charakteryzację serii nowych moczników oraz tiomoczników oraz jedną pochodną guanidyny, zawierających fragment modyfikowanej kolchicyny. Synteza pochodnych bazowała się na kilku klasycznych podejściach: reakcji amin z fosgenem (lub tiofosgenem), izocyjanianem (lub izotiocyjanianem), jak również chlorkami dialkylkarbamoylu. Wszystkich otrzymano 23 pochodnych, w większości, z bardzo dobrymi wydajnościami. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wyjściowa pochodna kolchicyny zawierała 2 grupy aminowe: 1° oraz 2° rzędowe, Autorce jednak udało się tak dobrać warunki reakcji by podstawienie zostało skierowane we właściwym kierunku. Otrzymane pochodne zostały prawidłowo scharakteryzowane z użyciem spektroskopii <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR oraz spektroskopii mas.

Substancje zostały również zbadane pod kątem określenia ich właściwości antyproliferacyjnej. Analiza otrzymanych wyników pozwala stwierdzić, że mimo umiarkowanej cytotoksyczności, część związków (2) miała wyróżniającą się zdolność do przełamania lekooporności referencyjnej linii komórkowej LoVo/DX, wtedy jak inna część (4) była selektywna względem komórek rakowych głównie MCF-7 oraz LoVo. Jedną najbardziej selektywną pochodną, zawierającą w części tiomocznika fragment

zabezpieczonego grupą izopropylidenową aminocukru, zdaniem współautorów, mogłaby być wybrana na kandydata do dalszych badań.

Od strony chemicznej przedstawione wyniki nie budzą zastrzeżeń.

*! Publikacja została dobrze przygotowana chociaż zawiera małoistotne nieścisłości. Przykładowo na stronie 2 pod tabelą występuje tajemnicza substancja R1R1C(O)Cl, a w części ESI często brakuje spacji, jak to np. ma miejsce w opisie syntezy substancji 17, 23, 24. Jest to jednak wada nieistotna.*

**Publikacja #5: ACS Omega 2021, 6, 40, 26583–26600.** Novel Double-Modified Colchicine Derivatives Bearing 1,2,3-Triazole: Design, Synthesis, and Biological Activity Evaluation

Udział mgr inż. Julii Krzywik w tej publikacji, który się sprowadzał się głównie do zaplanowania struktury cząsteczek, ich syntezy i identyfikacji, jak również do przygotowania manuskryptu i odpowiedzi recenzentom, został oszacowany na 65%.

W tej publikacji Autorka zwróciła uwagę na biologiczne podobieństwo grupy amidowej a 1,2,3-triazolowej które uznać należy za bioisostery.

Podobnie jak w poprzednich publikacjach Autorka wykorzystwała dobrze rozpoznane i dlatego wiarygodne narzędzia do syntezy pożądaných pochodnych. W pierwszym etapie syntezy kolchicyna została przekształcona w pochodną zawierającą w pozycji C10 grupę metylaminową, a w pozycji C7 grupę aminową. Następnie grupa aminowa została przekształcona w grupę azydkową z dobrą 58% wydajnością. W kolejnym etapie, gdzie następowało zamknięcie pierścienia triazolowego, Autorka wykorzystwała protokół klik-chemii, który pozwolił jej na otrzymanie różnorodnych produktów z umiarkowaną wydajnością. Syntetyczna część publikacji została podzielona na 4 rozdziały: synteza C4` podstawionych triazoli, gdzie podstawnik przy C4` pochodził bezpośrednio z wykorzystanych alkinów; synteza C4` podstawionych triazoli zawierających w pozycji C4` grupę karboksylową lub karboestrową; synteza C4` podstawionych triazoli zawierających w pozycji C4` grupę hydroksymetylową lub hydroksymetyloestrową; synteza C4` podstawionych triazoli zawierających w pozycji C4` grupę aminometylową, która następnie została wykorzystana w syntezie amidów i karbamatów. Wszystkich zostało otrzymano 40 nowych pochodnych, z nich 39 zawierały fragment triazolu.

Otrzymane substancje zostały prawidłowo scharakteryzowane, a odpowiednie widma: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, MS umieszczono w ESI.

Struktury otrzymanych związków zostały przanalizowane *in silico* na przedmiot właściwości fizykochemicznych i potencjalnej zdolności być wykorzystanymi jako środki terapeutyczne. Zostało pokazane, że wśród 39 pochodnych 28 mogą mieć zdolność przenikać błonę lipidową.

Testy biologiczne wykazały, że spora część testowanych związków są wysoce cytotoksyczne, a niektóre, jak to na przykład pochodna azydkowa, również aktywne wobec lekoopornej linii nowotworowej LoVo/DX. Z kolei dwie pochodne należące do grupy moczniaków wykazały się wysoką selektywnością wobec komórek nowotworowych. Ogólną konkluzją, zawartą w publikacji było



twierdzenie, że pochodne kolchicyny zawierające pierścień triazolu mają wysoki potencjał farmaceutyczny i opublikowane wyniki mogą być pomocne w opracowaniu nowych leków przeciwnowotworowych.

*! Koncepcja oraz wykonanie przedstawionych badań nie budzi zastrzeżeń, a uzyskane wyniki mają wysoka wartość naukową. Zauważyć również należy, że Autorka bardzo dobrze zaplanowała wszystkie ścieżki syntetyczne tak by jak najbardziej skrócić ilość etapów prowadzących do uzyskania pożądaných pochodnych.*

***! W ten sposób badania zaprojektowane i wykonane przez mgr inż. Julię Krzywik wykazały, że nowe modyfikacje struktury kolchicyny niosą ze sobą znaczne zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej cząsteczek, a w wielu przypadkach otrzymane związki były również wysoce selektywne i wyróżniały się zdolnością przelamywania lekooporności wybranej linii komórkowej. Badania również określiły najlepiej rokujące kierunki dalszych modyfikacji, a część otrzymanych związków została wytypowana do dalszych etapów badań biologicznych. Jest to niewątpliwie spore osiągnięcie, które może mieć również aspekt komercyjny.***

By ochronić wytworzona własność intelektualna, Trimen Chemicals Sp. Zoo, uzyskał 2 patenty Polskie, twórcą których jest mgr inż. Julia Krzywik.

**Patent #1: PL238376B1**, NOWE POCHODNE KOLCHICYNY I ICH ZASTOSOWANIE, dotyczy ochrony pochodnych kolchicyny zawierających grupę metyloaminową w pozycji C10, oraz podstawioną grupę aminową w pozycji C7 (gdzie podstawnikami przy atomie azotu są: różnorodne grupy alkilowe, grupy karbocykliczne i heterocykliczne, różnorodne amidowe pochodne i różnorodne karbaminianowe pochodne) oraz ich zastosowanie medyczne w szczególności w terapii nowotworów w tym gruczolaka płuc, piersi, jelita grubego również opornego na doksorubicynę. Patent zawiera 39 przykładów syntezy pochodnych oraz wyniki testów biologicznych wykonanych z zastosowaniem 5 linii komórkowych.

*! Uzyskanie patentu w przypadku omawianych badań uznać należy za uzasadnione, gdyż Autorka wykazała, że część zaprojektowanych substancji mogą zostać uznane za kandydata na nowego leku, wtedy jak inne pochodne, jeszcze nie otrzymane o strukturach objętych ochroną patentową, mogą być jeszcze bardziej aktywne. A więc chronione struktury mogą mieć zastosowanie komercyjne w przemyśle farmaceutycznym. Zastrzeżenie budzi jedynie fakt ze ochroną patentową wynalazek jest objęty jedynie w Polsce, chociaż specyfika rynku sugerowałaby raczej ochronę międzynarodową.*

**Patent #12: PL239901B1**, NOWE POCHODNE KOLCHICYNY I ICH ZASTOSOWANIE, dotyczy ochrony pochodnych kolchicyny zawierających grupę metyloaminową w pozycji C10, oraz podstawioną grupę aminową w pozycji C7 (gdzie podstawnikami przy atomie azotu są grupy: aminokarbonylowa, aminotiokarbonylowa, alkoksytiokarbonylowa, tioacylowa, w tym zawierające podstawniki

karbocylkiczne i heterocykliczne) oraz ich zastosowanie medyczne w szczególności w terapii nowotworów w tym gruczolaka płuc, piersi, jelita grubego również opornego na dokсорubicynę. Patent zawiera 17 przykładów syntezy pochodnych oraz wyniki testów biologicznych z zastosowaniem 5 linii komórkowych.

*! Uzyskanie patentu w przypadku omawianych badań uznać należy za uzasadnione, gdyż Autorka wykazała, że część zaprojektowanych substancji mogą zostać uznane za kandydatów na nowe leki, wtedy jak inne pochodne, jeszcze nie otrzymane o strukturach objętych ochroną patentową, mogą być jeszcze bardziej aktywne. A więc chronione struktury mogą mieć zastosowanie komercyjne w przemyśle farmaceutycznym. Zastrzeżenie budzi jedynie fakt ze ochroną patentową wynalazek jest objęty jedynie w Polsce.*

W ten sposób ochroną patentową w Polsce zostały objęte prawie wszystkie przedstawione w publikacjach pochodne. Co stwarza warunki do dalszej komercjalizacji przeprowadzonych badań.

***? Mimo dobrze rokujących wyników, Trimen Chemicals Sp. Zoo nie uzyskał ochrony nowych pochodnych zawierających pierścień triazolu oraz grypę azydkową. Dlaczego zdaniem Autorki substancji te mają mniejszy potencjał farmaceutyczny aniżeli te objęte ochroną?***

Kolejnym załącznikiem do rozprawy jest wydruk kopii **OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW** publikacji stanowiących cykl monotematyczny, z którego jednoznacznie wynika wnioski o wiodącej roli mgr inż. Julii Krzywik w wykonaniu badań oraz przygotowaniu manuskryptów publikacji (oraz patentów) tudzież w odpowiedzi recenzentom.

Przedstawione publikacje jasno świadczą, że Pani mgr inż. Julię Krzywik jest doświadczoną badaczką, która umiejętnie projektuje i wykonuje różnorakie syntezy organiczne, wykorzystując do tego rozległą wiedzę z zakresu chemii organicznej o reaktywności podstawowych grup funkcyjnych, pozwalającą jej skutecznie sterować selektywnością reakcji złożonych połączeń chemicznych pochodzenia naturalnego. Niewątpliwym wyzwaniem, które napotykają badacze pracujące z tak złożonymi substancjami, są wykonanie skomplikowanych procedur oczyszczania tych związków ze złożonych mieszanin reakcyjnych by otrzymać substancje czyste wymagane do badań biologicznych. Wyzwanie to, w przypadku prac Pani mgr inż. Julię Krzywik, zostało pomyślnie sprostane. Na uwagę zasługuje fakt zebrania i starannego opisanie danych spektroskopowych wszystkich otrzymanych związków, świadczące o wysokiej czystości produktów reakcji. Badania biologiczne oraz obliczenia komputerowe, co prawda, były wykonywane we współpracy, ale nie wątpliwie Doktorantka posiada niezbędną wiedzę również w tej dziedzinie, pozwalającą jej na opracowanie otrzymanych wyników,

przygotowanie publikacji naukowych oraz wniosków patentowych. Opracowane przez Doktorantkę rozwiązania praktyczne pozwalają rozważyć możliwość prowadzenia dalszych badań zmierzających do komercyjnego zastosowania wybranych pochodnych kolchicyny w przemyśle farmaceutycznym.

Na wysoką ocenę zasługuje również strona edytorska Rozprawy. Rozprawa została zredagowana w sposób czytelny i klarownie eksponuje osiągnięte wyniki prac. Lektura rozprawy nasunęła mi bardzo nieliczne drobne uwagi merytoryczne czy te o charakterze redakcyjnym, które zostały wymienione powyżej. Uwagi te nie mogą wpłynąć na pozytywną ocenę rozprawy. Jej lektura dowodzi, że postawione zadania zostały w pełni zrealizowane. Realizacja planowanych badań oraz redakcja rozprawy dowodzą, że jej Autorka jest wszechstronnie wykształconym chemikiem, zdolnym do samodzielnej realizacji złożonych programów z zakresu chemii organicznej, określania struktury nowych połączeń chemicznych, oraz właściwości biologicznych otrzymanych substancji; biegle wykorzystuje dostępne nowoczesne techniki eksperymentalne i obliczeniowe, bardzo umiejętnie interpretuje i prezentuje otrzymane wyniki oraz umie nawiązać i prowadzić współpracę naukową tam, gdzie są wymagane szczególne i bardzo specjalistyczne kompetencje.

W świetle tej oceny stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim przez paragraf 6.4 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. (Dz.U Nr. 204 poz. 1200 z dnia 22.09.2011) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM o dopuszczenie jej Autorki mgr inż. Julię Krzywik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponieważ opisane w Dysertacji wyniki zostały już opublikowane w formie pięciu publikacji oraz dwóch patentów i były publicznie omawiane w formie 4 ustnych prezentacji konferencyjnych i jednej prezentacji plakatowej, rozważenie możliwości uznania recenzowanej Rozprawy za wyróżniającą się pracę doktorską jest w pełni zasadne. Dlatego, z uwagi na powyższe, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Julię Krzywik.

Z wyrazami szacunku,

Kierownik  
Katedry Chemii

dr hab. Oleh Demchuk, prof. KUL